



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE BIOLOGICHE

L'AUTOFAGIA MEDIA LO STRESS E L'INFIAMMAZIONE DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO IN TUMORI GASTRICI RELATIVI ALL'*HELICOBACTER PYLORI*

AUTOPHAGY MEDIATES ER STRESS AND INFIAMMATION IN *HELICOBACTER PYLORI* RELATED GASTRIC CANCER

Tesi di laurea di:
AGATA PIA PARABOLA

Sessione estiva 2023
Anno accademico 2022/2023

Docente Referente
Chiar.mo prof
MARCO BARUCCA

INTRODUZIONE

Cos'è il tumore gastrico?

Il tumore gastrico o *adenocarcinoma gastrico* è un tumore maligno che si sviluppa nello stomaco.

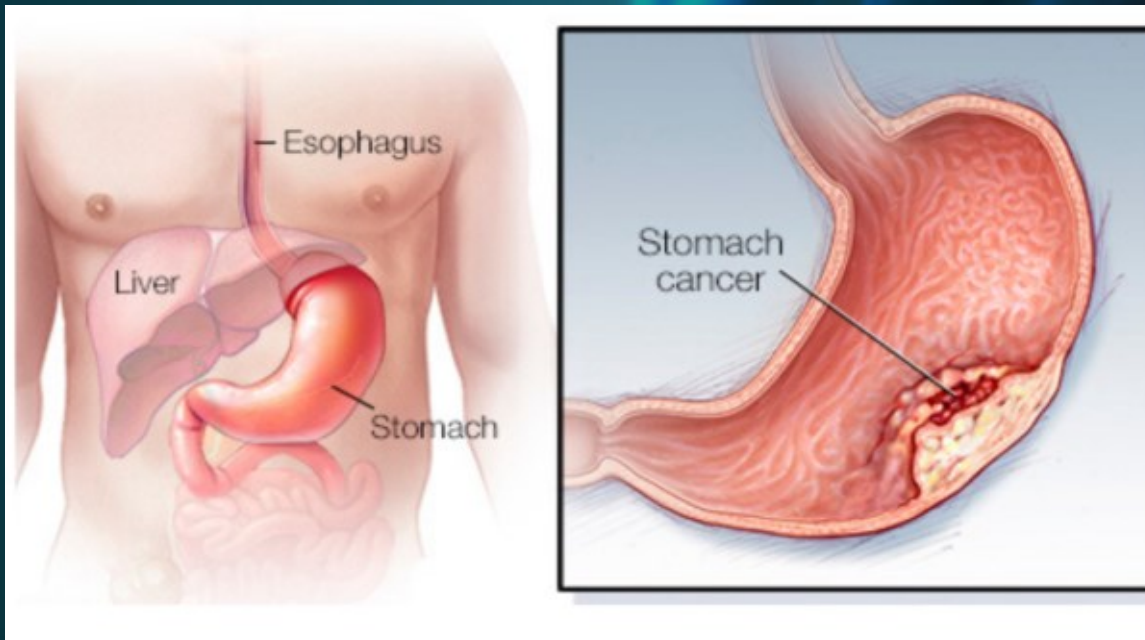


Figura 1.

- Con il termine «cancro» e «tumore» si fa riferimento ad una condizione patologica, caratterizzata dalla proliferazione incontrollata delle cellule
- Le cellule cancerose, in stadi molto avanzati della patologia, diffondono per contiguità formando le metastasi, le quali possono invadere i tessuti e gli organi adiacenti.
- All'origine del processo tumorale ci sono delle mutazioni genetiche (casuali o ereditarie), che si accumulano nel tempo e colpiscono **oncogeni** o **oncorepressori**.

INTRODUZIONE

Fattori di rischio: ***Helicobacter Pylori***

- *Helicobacter pylori* è un batterio spiraliforme che può colonizzare la mucosa gastrica.
- Riesce a sopravvivere nello stomaco, nonostante il pH molto acido di questo ambiente (pH = 2)
- Riconosciuto anche come l'agente cancerogeno di classe I associato al cancro gastrico (CG).

MODALITA' DI TRASMISSIONE:

- orale (più frequente)
- oro-fecale
- contatto con acque o con strumenti endoscopici contaminati

Il CG è preceduto da lesioni premaligne:

- *Gastrite atrofica*
- *Metaplasia intestinale (MI)*

Infine, può verificarsi la progressione verso lesioni maligne:

- *Displasia*
- *Cancro gastrico (CG)*

INTRODUZIONE

Fattori di rischio: **Il gene candidato**

Un altro fattore potenzialmente associato a sviluppo di CG è:

- *polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel **gene dell'autofagia ATG16L1 rs2241880***
(braccio lungo cromosoma 2)
il quale causa un difetto nel processo dell'autofagia, aumentando lo stress del RE nelle cellule intestinali.

L'autofagia

Nella carcinogenesi, può essere sfruttata come meccanismo protettivo nei confronti di farmaci che inducono l'apoptosi delle cellule tumorali.

Il gene candidato denota un cambiamento nella proteina in posizione 300 da treonina ad alanina:

- *l'allele A* → treonina (wild type)
- *l'allele G* → alanina (mutante)
- *L'allele A* è dominante sull'*allele G*, si parla di una *mutazione recessiva*.



Figura 2.

SCOPI

- Molti tipi di tumore portano ad un'elevata sintesi proteica che causa uno stress nel RE, sovraccaricandolo con proteine non ripiegabili (UPR). Nel caso del polimorfismo nel gene ATG16L1 *rs2241880* lo stress del RE aumenta.
- Durante lo studio, l'osservazione ricade sulle UPR (proteine dispiegate) e i marcatori dello stress nel RE, noti per essere indotti nel cancro gastrico.
- L'autofagia, il gene ATG16L, l'infiammazione e lo stress del RE sono stati tutti collegati a *Helicobacter Pylori*.
- In questo studio si è cercato di indagare questi processi sia nelle lesioni gastriche premaligne che nel cancro gastrico, in diversi gruppi etnici (europei e dell'Asia orientale).

Il più importante biomarcatore di stress nel RE è il:

chaperone GRP78

il quale è stato associato ad una scarsa sopravvivenza dei pazienti affetti da CG.

STUDI SULLA POPOLAZIONE

CASO STUDIO NELLA POPOLAZIONE AUSTRALIANA CAUCASICA

- **COORTE** → caucasici australiani con CG (n = 117)
controlli sani (n = 232).
- **OBIETTIVO 1** → dimostrare l'effetto del polimorfismo nel gene ATG16L1 rs2241880 nel CG
- **ESITO 1** → l'allele G (mutante), sembra essere un fattore di rischio per lo sviluppo del CG in questa popolazione.
- **OBIETTIVO 2** → dimostrare una possibile sinergia tra polimorfismo e l'infezione tra *H. Pylori* sul rischio di CG
- **ESITO 2** → gli individui portatori dell'allele G e infettati da *H. pylori* sono più a rischio rispetto a quelli che presentano genotipo AA.

CASO STUDIO NELLA POPOLAZIONE OLANDESE

- **COORTE** → individui con MI (n = 308)
divisi in:
Pazienti con lesioni premaligne lievi (stadio I o II)
Pazienti con lesioni premaligne gravi (stadio III o IV)
- **OBIETTIVO** → dimostrare l'effetto del polimorfismo nel gene ATG16L nelle lesioni premaligne (MI = metaplasia intestinale)
- **ESITO** → aumento del rischio di sviluppare lesioni premaligne lievi per individui con allele A (wild type).
Nessuna significatività, invece, per le lesioni premaligne gravi.
Di conseguenza l'allele G non è coinvolto nelle lesioni premaligne.

CASO STUDIO

Si analizzano le conseguenze funzionali del polimorfismo ATG16L *rs2241880* sullo stress del RE gastrico

OBIETTIVO → analisi dell'effetto della mutazione attraverso l'espressione di:

GRP78 (*chaperone proteico*)
biomarcatore dello stress del RE

elevata concentrazione
=
elevato stress nel RE.

ESITO → possiamo notare come la concentrazione del biomarcatore GRP78 aumenti nei tessuti gastrici che presentano MI rispetto che nei tessuti in condizioni sane. Dopo che i pazienti sono stati stratificati genotipicamente, non è stata osservata alcuna associazione tra il polimorfismo e l'espressione di GRP78 nelle biopsie antrali. Questi dati suggeriscono che i livelli di stress nel RE gastrico non sono influenzati di per sé ATG16L *rs2241880*

Lo stress del RE è modulato dal polimorfismo?

Biopsie antrali di pazienti con lesioni premaligne MI (popolazione olandese)

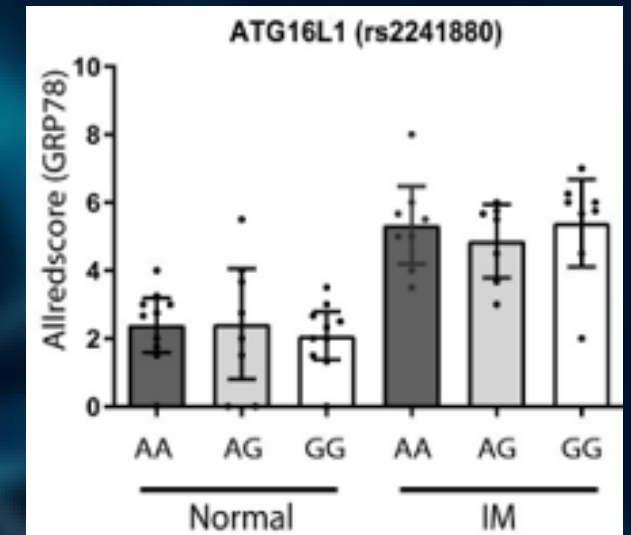


Figura 3.

CASO STUDIO

Si analizzano gli effetti dell'infezione di *Helicobacter Pylori* riguardo l'autofagia e lo stress del RE su due linee cellulari gastriche:



Lo stress del RE è modulato da *Helicobacter Pylori*?

TUNICAMICINA:
*antibiotico che induce
l'accumulo di proteine UPR nel
RE, induzione di stress*

➤ **FASE 1** → stimolazione delle due linee cellulari con *H. Pylori* in assenza di tunicamicina per 16h

Non è stata influenzata l'espressione di GRP78 in entrambe le linee cellulari

➤ **FASE 2** → stimolazione delle linee cellulari con *H. Pylori* in presenza di tunicamicina (induzione stress nel RE)

I livelli di GRP78 sono notevolmente diminuiti in entrambe le linee cellulari

ESITO → *H. Pylori* sembra indurre la via dell'autofagia per la sua replicazione, risolvendo quindi lo stress del RE indotto dall'antibiotico

In vivo → sono stati confrontati i livelli di GRP78 nei pazienti con l'infezione attiva durante prelievo biotico e nelle biopsie di questi individui dopo il trattamento di eradicazione. I livelli di stress del RE erano molto più bassi al momento dell'infezione di *H. Pylori*, mentre, dopo l'eradicazione di *H. Pylori*, GRP78 è aumentato significativamente.

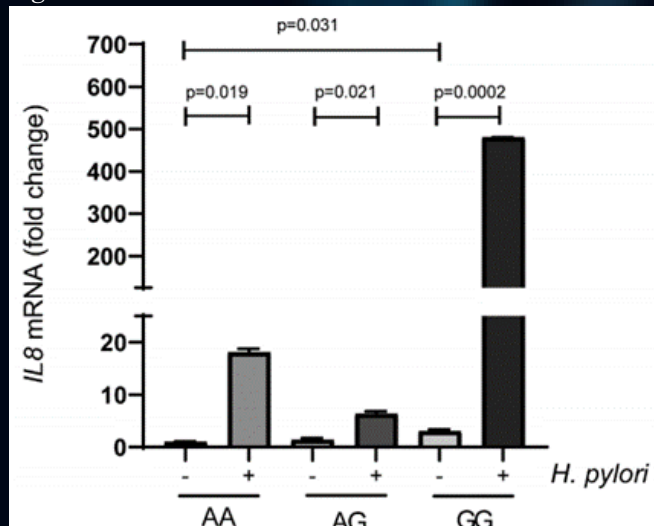
CASO STUDIO

Studi precedenti sul silenziamento di ATG16L1 hanno dimostrato che la conseguente perturbazione dell'autofagia è associata a un'elevata produzione dell'importante **citochina pro-infiammatoria IL-8** nelle cellule epiteliali, dimostrando che la produzione di IL-8 contribuisce alla genesi di CG in seguito a infiammazione di H. Pylori.

Si osserva l'effetto dei tre genotipi ATG16L1 rs2241880 sulla produzione di IL-8 nelle cellule:

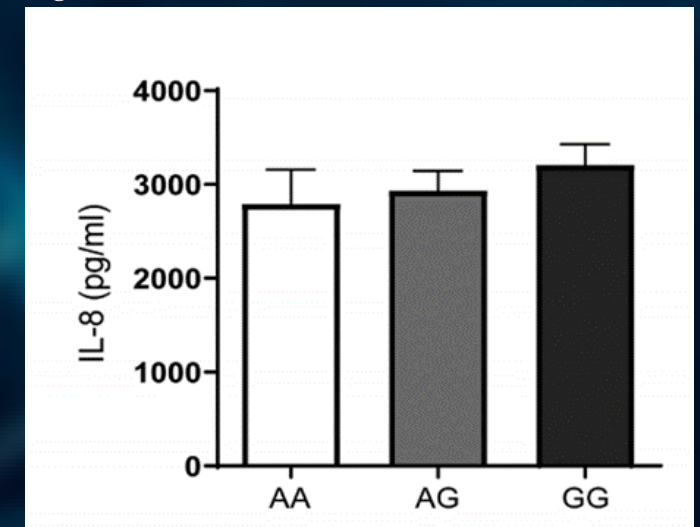
→ **AGS** & **PBMC**
(cell. cancerose gastriche) (cell immunitarie)

Figura 4.



In tutti e tre i genotipi è stata registrata una significativa espressione di **IL-8** in cellule **AGS** a seguito di infezione da H. Pylori

Figura 5.



IL-8 nelle **PBMC** è stata prodotta, dopo stimolazione con *H. Pylori*, senza una rilevante differenza tra i diversi genotipi.

ESITO → H. pylori induce la produzione di IL-8 nelle PBMC, la cui concentrazione non è influenzata dallo stato di ATG16L1 rs2241880.

Al contrario, la produzione di IL-8 è aumentata nelle cellule CG con genotipo GG.

Questi dati suggeriscono che nelle cellule immunitarie, il polimorfismo rs2241880 non influisce sulla produzione di IL-8.

CASO STUDIO

Si esplora ulteriormente il ruolo di ATG16L1 rs2241880 nella risposta immunitaria innata all'infezione di *H. Pylori* nelle cellule epiteliali gastriche:



Ipotesi → qual è il suo impatto nella tumorigenesi in presenza di *H. Pylori* e ATG16L1 rs2241880?

RISULTATI:

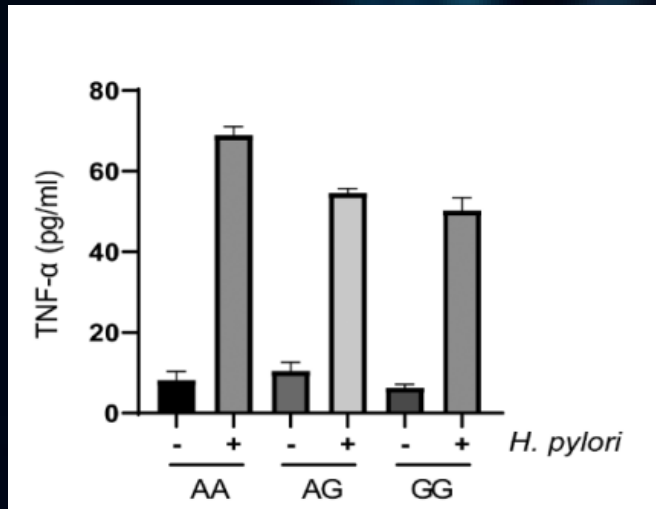


Figura 6.

Espressione dell'mRNA del TNFA in cellule AGS modificate e non modificate con di *H. pylori*

ESITO → Il ruolo della citochina pro-infiammatoria TNF- α nel cancro mostra proprietà sia anti che pro-tumorigeniche. I dati indicano che l'allele G di ATG16L1 rs2241880 riduce i livelli di TNF- α nelle cellule epiteliali gastriche quando infettate da *H. pylori*, mentre l'allele A ne determina un aumento

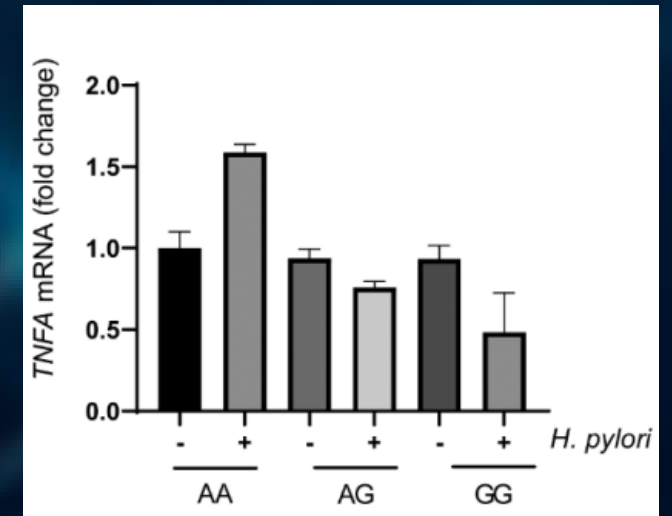


Figura 7.

Concentrazione di TNF- α in cellule AGS modificate e non modificate con *H. pylori*.

MATERIALI E METODI

SULLA POPOLAZIONE:

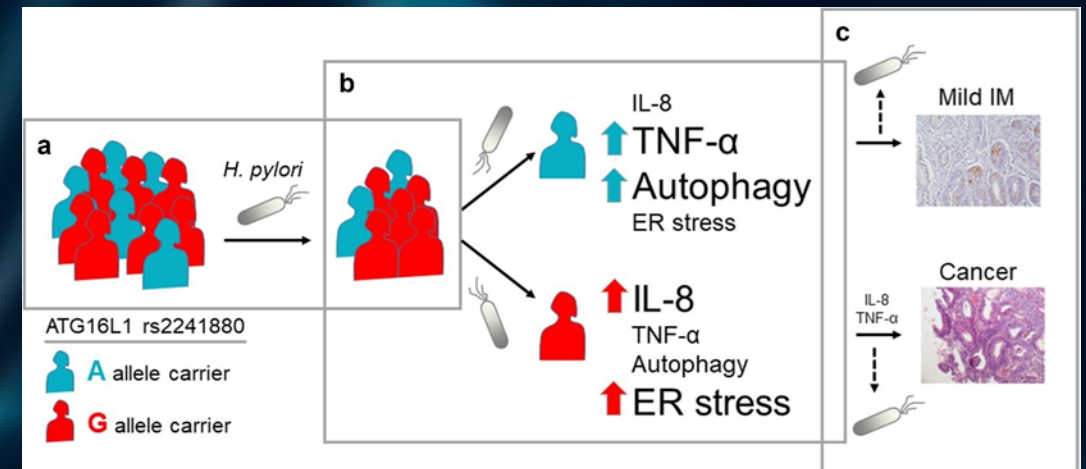
- Isolamento del DNA genomico umano e genotipizzazione (Isolamento DNA, PCR, digestione DNA e visualizzazione tramite Elettroforesi su gel);
- Analisi statistica → test di probabilità esatta di Fischer;

STUDI IN VITRO:

- Coltivazione delle linee cellulari:
 - cancerose dell'epitelio gastrico AGS e SK-GT-2
 - sane dell'epitelio gastrico GES-1
 - PBMC
- Editing del genoma con tecnologia CRISPR/Cas9 → per la produzione di linee cellulari figlie AGS
- Organoidi
- Immunoistochimica → quantificazione di GRP78
- Analisi RT-PCR

CONCLUSIONI

- ✓ E' stato osservato il ruolo del gene dell'autofagia ATG16L1 rs2241880 nella progressione della carcinogenesi gastrica mediata da *H. pylori*. Si suggerisce che un'autofagia difettosa promuova la tumorigenesi. Sebbene l'associazione tra *H. Pylori* e CG sia inconfutabile, il meccanismo è ancora poco chiaro.
- ✓ L'allele G è stato associato al rischio di CG nei caucasici australiani e questo rischio è risultato ulteriormente aggravato nei soggetti infettati da *H.pylori*. I dati della popolazione olandese suggeriscono che l'allele G non è associato allo sviluppo di lesioni premaligne precoci. Nel complesso, gli stadi di malattia lievi (I-II) e gravi (III-IV) non sono influenzati in modo simile da ATG16L1 rs2241880.
- ✓ Si ritiene che l'allele G ATG16L1 rs2241880 comprometta l'autofagia, che di per sé è necessaria per ridurre lo stress ER cellulare. Pertanto, ATG16L1 rs2241880 è associato a un maggiore accumulo di proteine dispiegate e di marcatori di stress ER nelle malattie gastrointestinali.
- ✓ E' stato dimostrato che l'*H. pylori* riduce i livelli di stress ER in vitro ed ex vivo, probabilmente attraverso l'induzione della via dell'autofagia. *H. pylori* attiva e utilizza la via dell'autofagia per la sua replicazione.
- ✓ Dopo aver analizzato anche il ruolo delle citochine IL-8 e TNF- α nella progressione del CG emerge un **modello** in cui una ridotta capacità autofagica veicolata dal genotipo ATG16L1 rs2241880 GG contribuisce alla carcinogenesi gastrica attraverso una maggiore produzione di IL-8 indotta dall'*H. pylori*, una diminuzione dei livelli di TNF- α e un aumento dei livelli di ER-stress.



RIASSUNTO ESTESO

- L'autofagia è un meccanismo di degradazione cellulare innescato dal batterio *Helicobacter pylori*.
- È stato dimostrato che un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel gene dell'autofagia ATG16L1 (rs2241880, allele G) disregola l'autofagia e aumenta lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) intestinale.
Si indaga sul ruolo di questo SNP nella carcinogenesi gastrica mediata da *H. pylori* e le sue vie molecolari.
ATG16L1 rs2241880 è stato genotipizzato in soggetti di diverse coorti etniche (olandesi e australiane) che presentavano lesioni gastriche premaligne di varia gravità.
- L'espressione di GRP78 (un marcatore dello stress ER) è stata valutata nei tessuti gastrici.
L'effetto di ATG16L1 rs2241880 sullo stress ER mediato da *H. pylori* e sull'induzione di citochine pro-infiammatorie è stato studiato in organoidi e linee cellulari.
La progressione del cancro gastrico è stato associata all'allele G di ATG16L1 rs2241880.
Le cellule metaplastiche intestinali nel tessuto gastrico dei pazienti hanno mostrato un aumento dei livelli di ER-stress.
- Modelli in vitro hanno dimostrato che *H. pylori* aumenta l'autofagia riducendo lo stress ER, che sembra in parte mediato dal genotipo ATG16L1 rs2241880. La produzione di IL-8 indotta dall'*H. pylori* è aumentata, mentre la produzione di TNF- α è diminuita, nelle cellule omozigoti per l'allele G.
- La modulazione dello stress del RE indotto dall'*H. pylori* e dei mediatori pro-infiammatori da parte di ATG16L1 rs2241880 può essere alla base dell'aumento del rischio di cancro gastrico.

FONTI IMMAGINI

Sfondo 1: “Helicobacter Pylori” chi è questo sconosciuto? Uliveto.it: <https://www.uliveto.it/salute-e-benessere/helicobacter-pylori-chi-e-questo-sconosciuto/>.

Sfondo 2: Dal tumore gastrico metastatico guarire si può: una nuova combinazione terapeutica migliorerebbe la sopravvivenza (2021) Ohga: <https://www.ohga.it/dal-tumore-gastrico-metastatico-guarire-si-puo-una-nuova-combinazione-terapeutica-migliorerebbe-la-sopravvivenza/>.

Sfondo 3: Shutterstock (2020) Helicobacter pylori: Contagio e Sintomi, My personal trainer: <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/helicobacter-pylori2.html>.

Sfondo 4: Shutterstock (2022) La mutazione genetica che rende i sapiens suscettibili al cancro, Focus: <https://www.focus.it/scienza/salute/mutazione-genetica-sapiens-cancro>.

Sfondo 5: «Cellula eucariote, cos'è, come è fatta, quali sono gli organelli e le loro funzioni» (2023) Geopop: <https://www.geopop.it/cellula-eucariote-cose-come-e-fatta-quali-sono-gli-organelli-e-le-loro-funzioni/> <https://www.geopop.it/>.

Sfondo 6: Shutterstock (2020) Focus junior: <https://www.focusjunior.it/scuola/geografia/popolazione-mondiale-quant-e-dove-sono-i-terrestri/>.

Sfondo 7: «Geni: informazioni chiave su come si attivano e disattivano» (2021) Medi magazine, <https://www.medimagazine.it/geni-informazioni-chiave-su-come-si-attivano-e-disattivano>

Figura 1: Tumore gastrico (2020) dott. Paolo Boati: <http://www.paoloboati.it/blog/tumoregastrico/>.

Figura 2: cembio (2019) «Polimorfismi» , Centro di medicina biologica: <https://www.centrodimedicinabiologica.it/polimorfismi/>.

Figura 3, 4, 5, 6, 7, 8: M.C. Mommersteeg, I. Simovic, B. Yu, S.A.V. van Nieuwenburg, I. M.J. Bruno, M. Doukas, E.J. Kuipers, M.C.W. Spaander, M.P. Peppelenbosch, N. Castaño-Rodríguez & G.M. Fuhler (2022) Autophagy mediates ER stress and inflammation in Helicobacter pylori-related gastric cancer, Gut Microbes, 14:1, 2015238, DOI: 10.1080/19490976.2021.2015238

BIBLIOGRAFIA

Articolo: M.C. Mommersteeg, I. Simovic, B. Yu, S.A.V. van Nieuwenburg, I. M.J. Bruno, M. Doukas, E.J. Kuipers, M.C.W. Spaander, M.P. Peppelenbosch, N. Castaño-Rodríguez & G.M. Fuhler (2022) Autophagy mediates ER stress and inflammation in Helicobacter pylori-related gastric cancer, Gut Microbes, 14:1, 2015238, DOI: 10.1080/19490976.2021.2015238;

«Il cancro dello stomaco», Lega contro il cancro (2023): <https://www.legacancro.ch/il-cancro/tipi-di-cancro/cancro-dello-stomaco-carcinoma-gastrico>;

«Tumore dello stomaco», Humanitas, : <https://www.humanitas.it/malattie/tumore-dello-stomaco/>;

«Helicobacter Pylori», EpiCentro: <https://www.epicentro.iss.it/helicobacter-pylori/>;

«L'helicobacter pylori è nemico o alleato?», AIRC (2023): <https://www.airc.it/cancro/prevenzione-tumore/prevenzione-per-tutti/lhelicobacter-pylori-e-nemico-o-alleato>

«Geni», Orphanet: https://www.orpha.net/consor//www/cgi-bin/Disease_Genes.php?lng=IT&data_id=19246&MISSING%20CONTENT=ATG16L1&search=Disease_Genes_Simple&title=ATG16L1
autofagia